

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 385–388

Plasminogengehalt eines im Handel befindlichen Rinderfibrinogens

Von H. Auel und M. Martin

Aus der Aggertalklinik, Klinik für Gefäßerkrankungen, (Chefarzt: Prof. Dr. W. Schoop) Engelskirchen bei Köln

(Eingegangen am 10. Dezember 1973/26. April 1974)

Da Rinderfibrinogen die Basis für viele gerinnungsphysiologische Untersuchungen darstellt, wurde mit Hilfe der Fibrin-Plattentechnik und einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems durch die direkte Umwandlung des Plasminogens in Plasmin mittels Urokinase untersucht, wieviel Plasminogen dem Rinderfibrinogen anhaftet. Aus dem Verhältnis zwischen Verdünnungsstufen des Rinderfibrinogens und des Humanplasmas mit gleicher fibrinolytischer Aktivität war zu ersehen, daß die Relation Plasminogen zu Fibrinogen im Rinderfibrinogen (Behring) im Mittel um das 2,7-fache höher lag als in einer Euglobulinfraktion eines normalen menschlichen Mischplasma ($n = 60$).

The plasminogen content of a commercially available bovine fibrinogen

Since fibrinogen serves as the basis for many investigations into the physiology of coagulation, its plasminogen content is of interest. The plasminogen content was determined with the aid of the fibrin plate technique; the fibrinolytic system was activated by the direct conversion of plasminogen into plasmin with the aid of urokinase. The dilution steps of the bovine fibrinogen and of human plasma with the same fibrinolytic activity were compared. It was shown that the ratio of plasminogen to fibrinogen (Behring) was on average 2.7 times higher than that of a euglobulin fraction from normal human mixed plasma ($n = 60$).

Rinderfibrinogen, die Basis für viele gerinnungsphysiologische Untersuchungen, hat in den Gerinnungslaboratorien einen festen Platz bei der Durchführung der Zweiphasen-Prothrombinbestimmung (1), des Prothrombinverbrauchstests (2), der Plasminogenbestimmung (3) und der quantitativen Streptokinasebestimmung (4).

Für verschiedene praktische und theoretische Aspekte, insbesondere der fibrinolytischen Testmethoden, war die Frage, wieviel Plasminogen das Rinderfibrinogen der Behringwerke AG, Marburg/Lahn, enthält, von Wichtigkeit.

Im Folgenden wurde versucht, mit Hilfe der Fibrin-Plattentechnik (5) diese Frage zu beantworten.

Plasminogen ist die inaktive Vorstufe des fibrinolytischen Enzyms Plasmin (EC 3.4.21.7) und kann durch Blut- bzw. Gewebsaktivatoren oder Urokinase (EC 3.4.99.26) in dieses umgewandelt werden. Das Substrat von Plasmin stellt u. a. Fibrin dar, welches durch die Enzymwirkung in verschiedene Bruchstücke abgebaut wird.

Mit Hilfe der Fibrinplatten-Methode können derartige fibrinolytische Plasmin-Quantitäten erfaßt werden. Die Aktivierung des fibrinolytischen Systems erfolgte im vorliegenden Fall durch direkte Umwandlung des Plasminogens mit Hilfe von Urokinase. Als Bezugssystem bietet sich die Plasminogenkonzentration von gepooltem Humanplasma an. Hier müssen allerdings vor Umwandlung des Plasminogens in Plasmin die Inhibitoren (Antiplasmin) ausgeschaltet werden. Dies war durch

Ausfällen der Euglobuline nach von *Kaulla* und *McDonald* (6) möglich.

Material und Methoden

Herstellung erhitzter Rinder-Fibrinplatten in Anlehnung an *Lassen* (7)

Reagenzien

Rinderfibrinogen, Fläschchen zu 60 mg (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

Veronalpuffer pH 7,8 – Ionenstärke 0,1

Die Stammlösung enthält 0,1 mol Barbitol-Natrium (20,62 g) und 0,137 mol NaCl ad 1000 ml dest. Wasser.

Gebrauchspuffer: 495 ml Stammlösung, 255 ml 0,1 mol/l HCl und 225 ml dest. Wasser

Thrombin: Fläschchen zu 3000 E (Topostasin, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach/Baden)

Physiologische NaCl-Lösung

Gang der Herstellung

120 mg Rinderfibrinogen wurden in 60 ml Veronalpuffer pH 7,8 gelöst und filtriert (Filter 595, ϕ 11 cm, Schleicher & Schüll, Dassel/Kreis Einbeck).

3000 E Thrombin (Topostasin) wurden in 6,0 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst. 0,5 ml dieser Lösung + 4,5 ml physiologische NaCl-Lösung ergaben 50 E/ml Thrombin.

7 Petrischalen wurden bereitgestellt. In jede Schale Einpipetieren von 8,0 ml Fibrinogenlösung und unter ständiger Bewegung 0,4 ml Thrombinlösung.

Schalen verschließen, zum Aufnehmen des Kondenswassers Deckel mit Filterpapier auslegen. Die Fibrinplatten für 1 Stunde bei 37°C belassen, anschließend für 45 Minuten bei 85°C erhitzen. Abkühlen im Brutschrank, Aufbewahren im Kühlschrank. Die Plasminogenfreiheit wurde stets durch Auftropfen von Urokinaselösung und anschließender Inkubation nachgewiesen.

Aufarbeitung des Human-Mischplasma, Zubereitung von Euglobulin nach von Kaulla und McDonald (6)

Reagenzien

Citratplasma von 60 gesunden Probanden (Klinikpersonal, Patienten mit statischen Beschwerden).

9 Teile Blut + 1 Teil Natriumcitrat 3,8 %, zentrifugiert bei 2.500 U/min für 10 Minuten.

Michaelis-Puffer pH 7,8 – Ionenstärke 0,1

EDTA-Lösung 10 g/l

CO₂ (Gasflasche)

Zubereitung von Euglobulin

1,5 ml Citrat-Mischplasma wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben mit 22,5 ml dest. Wasser verdünnt. Anschließend 4 Minuten Begasen mit CO₂. Der Gasstrom wurde so eingestellt, daß sich der Flüssigkeitsspiegel bewegte, aber nicht schäumte. Bereits nach 1 Minute war eine deutliche Trübung zu erkennen.

Durch die CO₂-Begasung war eine sehr konstante Einstellung des pH-Wertes auf $5,32 \pm 0,12$ zu erzielen. Die Plasmaverdünnung wurde unmittelbar nach dem Begasen für 10 Minuten bei 2.500 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend Lösen des Sedimentes in 1,4 ml Michaelis-Puffer pH 7,8 und 0,1 ml EDTA (10 g/l)

Herstellen der Rinderfibrinogen-Lösung

8 Fläschchen Rinderfibrinogen unterschiedlicher Chargen (1004 B, 1005 C, 1008 D, 1017 B, 1023 A, 1023 B, 1025 B, 1030 A) zu je 60 mg wurden mit je 5,0 ml Michaelis-Puffer pH 7,8 aufgefüllt und zur Lösung über Nacht im Brutschrank bei 37°C belassen.

Das so gelöste Rinderfibrinogen wurde mit Michaelis-Puffer auf 20 ml aufgefüllt und anschließend filtriert (Filter 595, ϕ 11 cm, Schleicher & Schüll, Dassel/Kreis Einbeck).

Bestimmung des Fibrinogengehaltes

Der Fibrinogengehalt der einzelnen Rinderfibrinogenlösungen wurde gravimetrisch nach Gram (8) wie folgt ermittelt. 2,0 ml Rinderfibrinogenlösung wurden mit 10 NIH E Thrombin (gelöst in 0,1 ml physiol. NaCl-Lösung) versetzt und für 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C belassen. Das Gerinnsel wurde vorsichtig von der Glaswand gelöst, in Filterpapier ausgepreßt und für einige Male in physiol. NaCl-Lösung und anschließend in dest. Wasser ausgewaschen. Nach erneutem Auspressen in Filterpapier wurde das Fibrin nun zweimal in absol. Alkohol und zweimal in Äther zum Entwässern gebracht. Das so gewonnene Fibrin wurde nun für einige Stunden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt und dann auf einer Analysenwaage ausgewogen.

Ermittlung der zur Plasminogen-Plasmin-Umwandlung optimalen Urokinasemenge

500.000 CTA-Einheiten Urokinase (Hoffman-La Roche & Co. Ltd., Basel/Schweiz) wurden in 5,0 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst.

Durch mehrere geometrische Verdünnungsreihen wurden unterschiedliche Urokinase-Konzentrationen erzielt.

0,1 ml Urokinase-Lösung jeder Verdünnungsstufe wurden mit je 1,0 ml Euglobulinlösung (enthielt Euglobulin von 1,0 ml Mischplasma) versetzt. Anschließend erfolgte die Bemessung erhitzter Rinder-Fibrinplatten mit 0,05 ml dieser Proben. Nach 18 Stunden Inkubation bei 37°C Ermittlung der Urokinase-Konzentration, bei der eine deutliche Abnahme der fibrinolytischen Aktivität zu sehen war.

Bei Urokinase-Konzentrationen von 5.000 000 bis 10.000 E/l Euglobulinlösung wurde immer ein Lysehof mit einem Durchmesser-Quadrat von 118 mm² registriert. Erst die nachfolgenden Urokinase-Konzentrationen von 6.000 bis 40 E/l Euglobulinlösung zeigten eine deutliche Abnahme der fibrinolytischen Aktivität. Bei einer Urokinase-Konzentration von 40 E/l Euglobulinlösung lag das Quadrat des Durchmessers des Lysehofs nur noch bei 49 mm² (Abb. 1). Eine Hemmung der fibrinolytischen Aktivität bei sehr hoher Urokinase-Konzentration (z. B. 1.250 000 E/l Euglobulinlösung) wurde nicht beobachtet.

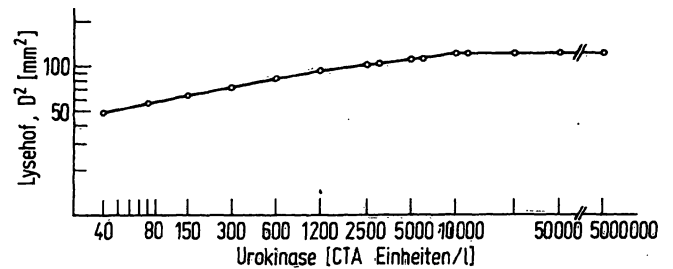


Abb. 1. Ermittlung der zur Plasminogen-Plasmin-Umwandlung optimalen Urokinasemenge mit Hilfe der Fibrinplatten-Methode. Bei Urokinase-Konzentrationen von $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^4$ E/l Euglobulinlösung wurde immer ein Lysehof mit einem Durchmesser-Quadrat von 118 mm² registriert. Erst die nachfolgenden Urokinase-Konzentrationen von $6 \cdot 10^3$ bis 40 E/l Euglobulinlösung zeigten eine deutliche Abnahme der fibrinolytischen Aktivität.

Für die Austestung des Rinderfibrinogens wurde deshalb eine Urokinase-Konzentration von 1.000 000 E/l physiologischer NaCl-Lösung gewählt. Davon wurde 0,1 ml zu 1,0 ml Euglobulinlösung bzw. zu 1,0 ml Rinderfibrinogenlösung gegeben.

Ergebnisse

Fibrinogengehalt der einzelnen Rinderfibrinogenlösungen

Nach gravimetrischer Fibrinogenbestimmung wurden in den einzelnen Rinderfibrinogenlösungen unterschiedlicher Chargen folgende Fibrinogen-Konzentrationen ermittelt:

| | |
|-------------|-------------------|
| Chargen-Nr. | 1004 B – 2,95 g/l |
| | 1005 C – 1,70 g/l |
| | 1008 D – 2,20 g/l |
| | 1017 B – 2,45 g/l |
| | 1023 A – 2,55 g/l |
| | 1023 B – 2,57 g/l |
| | 1025 B – 2,25 g/l |
| | 1030 A – 2,62 g/l |

Plasminogenbestimmung

Reihe A

Zur Ermittlung des Plasminogengehaltes von Rinderfibrinogen wurde zunächst Euglobulinlösung (1,0 ml Euglobulinlösung enthielt Euglobulin von 1,0 ml Citrat-Mischplasma) im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 mit Michaelis-Puffer pH 7,8 verdünnt. Je 1,0 ml dieser Verdünnungsstufen wurden mit 100 E Urokinase (in 0,1 ml physiol. NaCl-Lösung) versetzt, davon wurden 0,05 ml auf die Fibrinplatten gesetzt und nach Inkubation (18 Stunden bei 37°C) die Durchmesser der Lysehöfe gemessen und deren Quadrat berechnet.

Jede Verdünnungsstufe wurde vierfach ausgetestet, mit Hilfe der Mittelwerte wurde eine Eichgerade auf doppelt-logarithmiertem Papier erstellt (Ordinate: Quadrate der Durchmesser der Lysehöfe; Abszisse: Verdünnungsstufen).

Reihe B

Analog zu Reihe A wurden die Rinderfibrinogenlösungen der 8 verschiedenen Chargen ebenfalls im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 verdünnt und je 1,0 ml der Verdünnungen mit 100 E Urokinase (in 0,1 ml physiol. NaCl-Lösung) versetzt.

Aufbringen von 0,05 ml des Gemisches auf Fibrinplatten und nach Inkubation (18 Stunden bei 37°C) Bestimmung der Lysehofdurchmesser und -Quadrate. Die ermittelten Werte (Einfachbestimmungen) wurden ebenfalls auf doppelt-logarithmiertem Papier aufgetragen und durch Einzeichnen einer Geraden zueinander in Beziehung gebracht.

Es bestanden somit 1 Eichgerade aus vier Verdünnungsstufen einer Euglobulinlösung, sowie je 1 Eichgerade aus vier Verdünnungsstufen der einzelnen Rinderfibrinogenlösungen. Wir beobachteten einen mittleren Wert des Quadrats des Lysehofdurchmessers von 140 mm².

Die Verdünnungen, die eine derartige lytische Aktivität entwickelten, besaßen einen gleichen Plasminogen (bzw. Plasmin) -Gehalt.

Für Reihe A (Referenzwerte aus Human-Euglobulin) war dies eine bestimmte Verdünnung 1 : a und für Reihe B (Rinderfibrinogen) 1 : b. Die Plasminogenkonzentration (x %) in Reihe B, ausgedrückt in Konzentration der Reihe A, errechnete sich durch folgenden Ansatz (Abb. 2, Tab. 1):

$$\frac{100\%}{a} = \frac{x\%}{b} \quad x\% = \frac{100\% \cdot b}{a}$$

Um die Plasminogenkonzentrationen im Humanplasma bzw. in den Rinderfibrinogenlösungen zum Fibrinogengehalt korrelieren zu können, bezogen wir den Plasminogengehalt auf 1,0 g/l Fibrinogen.

Für Humanplasma wurde bei 2,84 g/l Fibrinogen (gravimetrisch ermittelt) der Plasminogengehalt als 100 % definiert. Die Plasminogenkonzentration, bezogen auf eine gewählte Fibrinogenkonzentration von 1 g/l, errechnete sich nach der Formel:

$$\frac{100\%}{2,84 \text{ g/l}} = \frac{x\%}{1,0 \text{ g/l}}$$

$$x\% = \frac{100}{2,84}$$

$$x\% = 35,2\%$$

Für diese Fibrinogenkonzentration (1,0 g/l) konnte nunmehr auch der Plasminogengehalt der einzelnen Rinderfibrinogen-Chargen errechnet werden (Tab. 1).

Das Verhältnis von Rinderplasminogen zu Humanplasminogen (bezogen auf 1,0 g/l Fibrinogen) wurde bestimmt und in Tabelle 1 zusammengestellt.

Der Mittelwert dieses Verhältnisses betrug $\bar{x} \pm s = 2,7 \pm 0,87$.

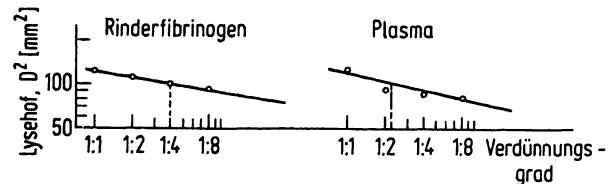


Abb. 2. Beispiel zur Ermittlung des Plasminogengehaltes von Rinderfibrinogen und Human-Mischplasma mit Hilfe der Fibrinplatten-Methode. Die Durchmesser der Lysehöfe wurden gemessen und die Quadrate der Durchmesser errechnet. Die ermittelten Werte wurden auf doppelt-logarithmiertem Papier aufgetragen und durch Einzeichnen einer Geraden zueinander in Beziehung gebracht.

| Charge | Rinderfibrinogen [g/l] | Plasminogengehalt x [%] | Rinder-Plasminogen pro 1 g/l Fibrinogen [%] | Verhältnis von Rinder-Plasminogen zu Human-Plasminogen pro 1 g/l Fibrinogen |
|-----------|---------------------------|----------------------------|---|--|
| 1004 B | 2,95 | 215 | 72,9 | 2,1 : 1 |
| 1005 C | 1,70 | 240 | 141,2 | 4,0 : 1 |
| 1008 D | 2,20 | 210 | 95,5 | 2,7 : 1 |
| 1017 B | 2,45 | 240 | 98,0 | 2,8 : 1 |
| 1023 A | 2,55 | 300 | 117,6 | 3,3 : 1 |
| 1023 B | 2,57 | 200 | 77,8 | 2,2 : 1 |
| 1025 B | 2,25 | 100 | 44,4 | 1,3 : 1 |
| 1030 A | 2,62 | 320 | 122,1 | 3,5 : 1 |
| \bar{x} | 2,41 | | 96,2 | 2,7 |
| s | 0,37 | | ± 31,0 | ± 0,87 |

Besprechung und Zusammenfassung

Die Frage, wieviel Plasminogen dem Rinderfibrinogen anhaftet, wurde unseres Wissens in der Literatur noch nicht erörtert.

Da Rinderfibrinogen die Basis für viele gerinnungsphysiologische Untersuchungen darstellt, wurde versucht, mit Hilfe der Fibrin-Plattentechnik und einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems durch die direkte Umwandlung des Plasminogens in Plasmin mittels Urokinase diese Frage zu beantworten.

Nach Ermittlung des zur Plasminogen-Plasmin-Umwandlung optimalen Urokinasegehaltes erfolgte die Gegenüberstellung einer konstanten Menge Rinderfibrinogen mit einem Human-Mischplasma in Hinsicht auf deren Plasminogengehalt.

Die ermittelten Quadrate der Durchmesser der Lysehöfe wurden auf doppeltlogarithmiertem Papier aufgetragen und durch Einzeichnen einer Geraden zueinander in Beziehung gebracht.

Aus dem Verhältnis zwischen Verdünnungsstufen des Rinderfibrinogens und des Humanplasmas mit gleicher fibrinolytischer Aktivität war zu ersehen, daß die Relation Plasminogen zu Fibrinogen im Rinderfibrinogen (Behring) im Mittel um das 2,7-fache höher lag als in einer Euglobulinfraktion aus normalem menschlichem Mischplasma (n = 60).

Literatur

1. Schultze, H. E. & Schwick, G. (1953), Medizinische Nr. 42 u. 43, S. 1354 u. 1386.
2. Quick, A. J. (1947), Amer. J. Med. Sci. 214, 272–280.
3. Martin, M. (1969), Thromb. Diath. Haemorrh. 22, 121–137.
4. Martin, M., 80. Verhandl. d. Dtsch. Ges. inn. Med. 21–25. April 1974, Wiesbaden.
5. Astrup, T. & Müllertz, S. (1952), Arch. Biochem. 40, 346–351.
6. v. Kaulla, K. N. & Mc Donald, T. S. (1958), Blood 13, 811–821.
7. Lassen, M. (1952), Acta Physiol. Scand. 27, 371–376.
8. Gram, H. C. (1921), J. Biol. Chem. 49, 279–295.

H. Auel und
Priv.-Doz. Dr. M. Martin
5250 Engelskirchen
Aggertalklinik